

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-108683  
(P2001-108683A)

(43) 公開日 平成13年4月20日 (2001.4.20)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード*(参考)
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/566	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平11-292141	(71) 出願人	000005201 富士写真フイルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地
(22) 出願日	平成11年10月14日 (1999.10.14)	(72) 発明者	篠木 浩 埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ イルム株式会社内
		(72) 発明者	須藤 幸夫 埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ イルム株式会社内
		(74) 代理人	100074675 弁理士 柳川 泰男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA断片固定固相担体、DNA断片の固定方法および核酸断片の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 固相担体表面に、予め調製したDNA断片を簡便かつ安価な方法によって共有結合させる固定方法、DNAチップおよび核酸断片の検出方法を提供すること。

【解決手段】 固相担体表面に一方の末端で固定された鎖状分子に、アミド結合を介してDNA断片が固定されているDNA断片固定固相担体。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 固相担体表面に一方の末端で固定された鎖状分子に、アミド結合を介してDNA断片が固定されていることを特徴とするDNA断片固定固相担体。

【請求項2】 固相担体表面に、自由末端にカルボン酸基を有する鎖状分子を他方の側の末端にて結合された連結基を形成する工程、そして、該連結基のカルボン酸基と、一方の末端にアミノ基を有するDNA断片の該アミノ基とを反応させることにより、アミド結合を形成させる工程を順次行うことを特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法。

【請求項3】 自由末端にカルボン酸基を有する鎖状分子を、固相担体表面に、アミノ基を有するシランカップリング剤を接触させることによって導入したアミノ基と、無水コハク酸とを反応させて製造することを特徴とする請求項2に記載のDNA断片の固相担体表面への固定方法。

【請求項4】 DNA断片として、その塩基配列が既知であるものを用いることを特徴とする請求項2に記載のDNA断片の固定方法。

【請求項5】 請求項1に記載のDNA断片固定固相担体に、蛍光物質で標識した核酸断片試料を溶解あるいは分散してなる水性液を点着した後、インキュベートして、該DNA断片固定固相担体に固定されているDNA断片と核酸断片試料とで形成されたハイブリッドDNAを検出することを特徴とする、該DNA断片固定固相担体に固定されているDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子の発現、変異、多型等の同時解析に非常に有用である、多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相表面に整列させた高密度アレイ（DNAチップ）の作製に必要な、DNA断片の固相担体表面への固定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】多彩な生物の全遺伝子機能を効率的に解析するための技術開発が進んでいる。DNAチップは、スライドガラス等の固相担体に多数のDNA分子を整列させたマイクロアレイであり、遺伝子の発現、変異、多型性等の同時解析に非常に有用である。このDNAチップを用いるDNAチップ技術は、DNA以外の生体分子にも適用可能であり、創薬研究、疾病の診断や予防法の開発、エネルギーや環境問題対策等の研究開発に新しい手段を提供するものとして期待されている。

【0003】DNAチップ技術が具体化してきたのは、DNAの塩基配列をオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって決定する方法（SBH: sequencing by hybridization）が考案されたことに始まる（Drmanac, R. et

al., Genomics, 4, page 114 (1989)）。SBHは、ゲル電気泳動を用いる塩基配列決定法の限界を克服できる方法ではあったが、実用化には至らなかった。

【0004】その後、DNAチップ作製技術が開発され、遺伝子の発現、変異、多型等を短時間で効率よく調べる、いわゆるHTS (high-throughput screening) が可能となった（Fodor, S. P. A., Science, 251, page 767 (1991) および Schena, M., Science, 270, page 467 (1995)）。

【0005】しかし、DNAチップ作製技術を実用化するためには、多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相担体表面に整列させるためのDNAチップの作製技術が必要とされる。作製されたDNAチップ上のDNA断片は、一般的には、標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションによって検出される。

【0006】DNAチップの作製方法としては、固相担体表面で直接DNA断片を合成する方法（「オン・チップ法」という。）と、予め調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法とが知られている。オン・チップ法としては、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィ技術および固相合成技術とを組み合わせ、微少なマトリックスの所定の領域での選択的合成を行う方法（「マスキング技術」という。）が代表的である。

【0007】予め調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法は、DNA断片の種類や固相担体の種類に応じて下記の方法がある。

(1) 固定するDNA断片がcDNA (mRNAを鋳型にして合成した相補的DNA) やPCR産物 (cDNAをPCR法によって増幅させたDNA断片) の場合には、これらをDNAチップ作製装置に備えられたスポット装置を用いて、ポリ陽イオン (ポリリシン、ポリエチレンジアミン等) で表面処理した固相担体表面に点着し、DNAの荷電を利用して固相担体に静電結合させるのが一般的である。また、固相担体表面の処理方法として、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有するシランカップリング剤を用いる方法も利用されている（Geo, Z. et al., Nucleic Acids Research, 22, 5456-5465 (1994)）。この場合には、アミノ基、アルデヒド基等は、共有結合により固相担体表面に導入されるため、ポリ陽イオンによる場合と比較して安定に固相担体表面に存在する。

【0008】DNAの荷電を利用する方法の変法として、アミノ基で修飾したPCR産物をSSC (標準食塩ークエン酸緩衝液) に懸濁させ、これをシリル化したスライドガラス表面に点着し、インキュベートした後、水

素化ホウ素ナトリウムによる処理および加熱処理を順に行う方法が報告されている (Schena, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10614-10619 (1996))。しかし、この固定方法では必ずしも十分な安定度が得られ難いという問題がある。DNAチップ技術では、検出限界が重要となる。そのため、固相担体表面に十分な量で安定にDNAが固定されることは、DNAと標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションの検出限界の向上に直接繋がる。

【0009】(2) 固定するDNA断片が合成オリゴヌクレオチドの場合には、反応活性基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、表面処理した固相担体表面に該オリゴヌクレオチドを点着し、共有結合させる(「蛋白質・核酸・酵素」、43巻、(1998)、2004-2011, Lamture, J. B et al., Nucl. Acids Res., 22, 2121-2125, 1994、およびGuo, Z., et al., Nucl. Acids Res., 22, 5456-5465, 1994)。例えば、アミノ基を導入したスライドガラスに、PDC (p-フェニレンジイソチオシアネート) 存在下、アミノ基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法、および該スライドガラスに、アルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法が知られている。上記の二つの方法は、前記(1)のDNAの荷電を利用する方法と比べて、オリゴヌクレオチドが固相担体表面に安定に固定される。しかし、PDCを存在させる方法は、PDCとアミノ基導入オリゴヌクレオチドとの反応が遅く、アルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを用いる方法は、反応生成物であるシッフ塩基の安定性が低い(通常、加水分解が起こり易い)という問題点を有する。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、固相担体表面に、予め調製したDNA断片を迅速な反応によって結合させることが可能で、かつ、反応生成物が安定に結合を維持可能な固定方法、DNAチップ、および核酸断片の検出方法を提供することを、その課題とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、固相担体表面に一方の末端で固定された鎖状分子に、アミド結合を介してDNA断片が固定されていることを特徴とするDNA断片固定固相担体にある。

【0012】本発明は、また、固相担体表面に、自由末端にカルボン酸基を有する鎖状分子を他方の側の末端にて結合された連結基を形成する工程、そして、該連結基のカルボン酸基と、一方の末端にアミノ基を有するDNA断片の該アミノ基とを反応させることにより、アミド結合を形成させる工程を順次行うことを特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法にもある。

【0013】本発明のDNA断片の固相担体表面への固定方法の好ましい態様は、以下の通りである。

(1) 自由末端にカルボン酸基を有する鎖状分子を、固相担体表面に、アミノ基を有するシランカップリング剤を接触させることによって導入したアミノ基と、無水コハク酸とを反応させて製造する。

(2) DNA断片として、その塩基配列が既知であるものを用いる。

【0014】本発明は、さらに、本発明のDNA断片固定固相担体に、蛍光物質で標識した核酸断片試料を溶解あるいは分散してなる水性液を点着した後、インキュベートして、該DNA断片固定固相担体に固定されているDNA断片と核酸断片試料とで形成されたハイブリッドDNAを検出することを特徴とする、該DNA断片固定固相担体に固定されているDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法にもある。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明のDNA断片固定固相担体(以下「DNAチップ」という。)では、固相担体表面に一方の末端で固定された鎖状分子に、アミド結合を介してDNA断片が固定されている。DNA断片の固相担体表面への固定は、固相担体表面に、自由末端にカルボン酸基を有する鎖状分子を他方の側の末端にて結合された連結基を形成する工程、そして、該連結基のカルボン酸基と、一方の末端にアミノ基を有するDNA断片の該アミノ基とを反応させることにより、アミド結合を形成させる工程を順次行うことによって行う。

【0016】本発明の代表的な固定方法を図1に模式的に示す。鎖状分子(-L-COOH)は、自由末端カルボン酸基と、固相担体(M)表面と自由末端カルボン酸基とを結ぶ連結基(L)とからなる。鎖状分子を有する固相担体(1)は、表面にアミノ基を有する固相担体(4)の該アミノ基に、カルボン酸基導入試薬(X<sup>1</sup>)を反応させることによって得ることができる。鎖状分子を有する固相担体(1)の自由末端カルボン酸基を公知の方法によって活性化し、次いで、カルボン酸基が活性化された鎖状分子を有する固相担体と、一方の末端にアミノ基を有するDNA断片(2)とを反応させることによって、DNAチップ(3)を得ることができる。ここで、Yは、クロスリンカーを表す。Zは、固相担体表面へのアミノ基導入の方法によって決定される。連結基(L)は、Zおよびカルボン酸基導入試薬(X<sup>1</sup>)によって決定される。mは、0または1を表す。-リン酸エステル基-NNNN...NNは、DNA断片を表す。以下、図1の各工程について説明する。

【0017】固相担体としては、疎水性、あるいは親水性の低い担体であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低いものであっても好ましく用いることができる。固相担体の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミ

ックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、繊維物、不織布、沓紙、短繊維、メンブレンフィルター等の多孔質物質などを挙げることができる。多孔質物質の細孔の大きさは、2乃至1000nmの範囲にあることが好ましく、2乃至500nmの範囲にあることが特に好ましい。固相担体の材質は、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。固相担体の厚さは、100乃至2000 $\mu$ mの範囲にあることが好ましい。

【0018】固相担体は、DNA断片を固定させるため、その表面がポリ陽イオン（例えば、ポリーレーリン、ポリエチレンイミン、ポリアルキルアミン等であることが好ましく、ポリーレーリンであることがさらに好ましい）で被覆処理、あるいは固相担体表面への導入置換基を有するシランカップリング剤によって接触処理されていることが好ましく、固相担体表面への導入置換基を有するシランカップリング剤によって接触処理されていることが特に好ましい。固相担体表面への導入置換基としては、アミノ基であることが好ましい。ポリ陽イオンによる場合には、アミノ基が静電結合によって固相担体表面に導入されるのに対して、シランカップリング剤による場合には、共有結合によって導入されるため、アミノ基が固相担体表面に安定に存在する。アミノ基の他に、アルデヒド基、エポキシ基、カルボキシル基、水酸基あるいはチオール基も好ましく導入することができる。シランカップリング剤の例としては、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N- $\beta$ （アミノエチル） $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシランあるいはN- $\beta$ （アミノエチル） $\gamma$ -アミノプロピルメチルジメトキシシランを用いることが好ましく、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランを用いることが特に好ましい。

【0019】ポリ陽イオンを用いる処理に、シランカップリング剤による処理を組み合わせることもよい。疎水性、あるいは親水性の低い固相担体とDNA断片との静電的相互作用を促進することができる。表面処理がされた固相担体表面上に、さらに、電荷を有する親水性高分子等からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによって表面処理がされた固相担体の凹凸を軽減することができる。固相担体の種類によっては、その担体中に親水性高分子等を含有させることも可能であり、このような処理を施した固相担体も好ましく用いることができる。

【0020】Zは、該アミノ基の導入の方法によって決定されるもので、ポリ陽イオンを用いて導入した場合には、単結合（但し、静電的な結合）、該シランカップリング剤によって導入した場合には、シランカップリング

剤によって決定される。

【0021】カルボン酸基は、公知の合成反応によって導入することができるが、カルボン酸基導入試薬

(X<sup>1</sup>)を作用させることが好ましく、酸無水物を作用させることが特に好ましい。カルボン酸基導入試薬(X<sup>1</sup>)を作用させる際には、塩基を存在させてもよい。酸無水物としては、マロン酸、シュウ酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸あるいはフタル酸の無水物であることが好ましく、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸あるいはフタル酸の無水物であることがさらに好ましく、コハク酸の無水物であることが特に好ましい。これらの酸無水物は、その水素原子が置換されていてもよい。置換基としては、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が3乃至6のシクロアルキル基、炭素原子数が1乃至6のアルコキシ基、炭素原子数が1乃至6のアルケニル基、炭素原子数が1乃至6のアルキニル基、シアノ基、ハロゲン原子(F、Cl、Br等)および水酸基を挙げることができる。連結基(L)は、酸無水物の種類によって決定され、酸無水物がマロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸およびフタル酸の無水物であるとき、それぞれ、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、1,2-フェニレン基をカルボン酸基側に含む。塩基としては、無機塩基および有機塩基の何れも用いることができるが、1-メチル-2-ピロリドン、トリエチルアミン、ピリジン、炭酸カリウムあるいは炭酸ナトリウムを用いることがより好ましく、1-メチル-2-ピロリドン、トリエチルアミンあるいはピリジンを用いることがさらに好ましく、1-メチル-2-ピロリドンを用いることが特に好ましい。

【0022】カルボン酸基の活性化方法としては、公知の方法を用いることができる。ヒドロキシスクシンイミド、ヒドロキシフタルイミド等のヒドロキシイミド、塩化チオニル、オキサリルクロリド等の塩化物で処理することが好ましい。

【0023】クロスリンカー(Y)は、単結合、アルキレン基あるいはN-アルキルアミノ-アルキレン基であることが好ましく、単結合、ヘキシレン基あるいはN-メチルアミノ-ヘキシレン基であることが特に好ましい。

【0024】DNA断片は、目的によって二通りに分けることができる。遺伝子の発現を調べるためには、cDNA、cDNAの一部、EST等のポリヌクレオチドを使用することが好ましい。これらのポリヌクレオチドは、その機能が未知であってもよいが、一般的にはデータベースに登録された配列を基にしてcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリーあるいは全ゲノムをテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製する（以下、「PCR産物」という。）。PCR法によって増幅しないものも好ましく使用することができる。また、遺伝子の変異や多型を調べるには、標準となる既知の配列

をもとにして、変異や多型に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成し、これを使用することが好ましい。さらに、塩基配列分析の場合には、 $4^n$  ( $n$ は、塩基の長さ) 種のオリゴヌクレオチドを合成したものを使用することが好ましい。DNA断片の塩基配列は、一般的な塩基配列決定法によって予めその配列が決定されていることが好ましい。DNA断片は、2乃至50量体であることが好ましく、10乃至25量体であることが特に好ましい。

【0025】DNA断片には、固相担体表面の導入置換基と結合を形成するための反応活性基を一方の末端に導入する。反応活性基は、アミノ基である。

【0026】DNA断片の点着は、DNA断片を水性媒体に溶解あるいは分散した水性液を、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注し、分注した水性液をスポッター装置等を用いて固相担体表面上に滴下して行うことが好ましい。

【0027】点着後のDNA断片の乾燥を防ぐために、DNA断片が溶解あるいは分散してなる水性液中に、高沸点の物質を添加してもよい。高沸点の物質としては、DNA断片が溶解あるいは分散してなる水性液に溶解し得るものであって、試料核酸断片とのハイブリダイゼーションを妨げることがなく、かつ粘性の大きくない物質であることが好ましい。このような物質としては、グリセリン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシドおよび低分子の親水性ポリマーを挙げることができる。親水性ポリマーとしては、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸ナトリウム等を挙げることができる。ポリマーの分子量は、 $10^3$ 乃至 $10^6$ の範囲にあることが好ましい。高沸点の物質としては、グリセリンあるいはエチレングリコールを用いることがさらに好ましく、グリセリンを用いることが特に好ましい。高沸点の物質の濃度は、DNA断片の水性液中、0.1乃至2容量%の範囲にあることが好ましく、0.5乃至1容量%の範囲にあることが特に好ましい。また、同じ目的のために、DNA断片を点着した後の固相担体を、90%以上の湿度および25乃至50℃の温度範囲の環境に置くことも好ましい。

【0028】DNA断片を点着後、紫外線、水素化ホウ素ナトリウムあるいはシッフ試薬による後処理を施してもよい。これらの後処理は、複数の種類を組み合わせてもよく、加熱処理と紫外線処理を組み合わせても行うことが特に好ましい。これらの後処理は、ポリ陽イオンのみによって固相担体表面を処理した場合には特に有効である。点着後は、インキュベーションを行うことも好ましい。インキュベート後、未点着のDNA断片を洗浄して除去することが好ましい。

【0029】DNA断片は、固相担体表面に対して、 $10^2$ 乃至 $10^5$ 種類/cm<sup>2</sup>の範囲にあることが好ましい。DNA断片の量は、1乃至 $10^{-15}$ モルの範囲にあ

り、重量としては数ng以下であることが好ましい。点着によって、DNA断片の水性液は、固相担体表面にドットの形状で固定される。ドットの形状は、ほとんど円形である。形状に変動がないことは、遺伝子発現の定量的解析や塩基変異を解析するために重要である。ドット間の距離は、0乃至1.5mmの範囲にあることが好ましく、100乃至300μmの範囲にあることが特に好ましい。1つのドットの大きさは、直径が50乃至300μmの範囲にあることが好ましい。点着する量は、100pL乃至1μLの範囲にあることが好ましく、1乃至100nLの範囲にあることが特に好ましい。

【0030】上記の工程によって作製されたDNAチップの寿命は、cDNAが固定されてなるcDNAチップで数週間、オリゴDNAが固定されてなるオリゴDNAチップではさらに長期間である。これらのDNAチップは、遺伝子発現のモニタリング、塩基配列の決定、変異解析、多型解析等に利用される。検出原理は、後述する標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションである。

【0031】標識方法としては、RI法と非RI法（蛍光法、ビオチン法、化学発光法等）とが知られているが、本発明では蛍光法を用いる。蛍光物質としては、核酸の塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素（例えば、Cy Dye™シリーズのCy3、Cy5等）、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N'-アセチルアミノフルオレン（AAF）あるいはAAIF（AAFのヨウ素誘導体）を使用することができる。

【0032】試料核酸断片としては、その配列や機能が未知であるDNA断片試料あるいはRNA断片試料を用いることが好ましい。試料核酸断片は、遺伝子発現を調べる目的では、真核生物の細胞や組織サンプルから単離することが好ましい。試料がゲノムならば、赤血球を除く任意の組織サンプルから単離することが好ましい。赤血球を除く任意の組織は、抹消血液リンパ球、皮膚、毛髪、精液等であることが好ましい。試料がmRNAならば、mRNAが発現される組織サンプルから抽出することが好ましい。mRNAは、逆転写反応により標識dNTP（「dNTP」は、塩基がアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）もしくはチミン（T）であるデオキシリボヌクレオチドを意味する。）を取り込ませて標識cDNAとすることが好ましい。dNTPとしては、化学的な安定性のため、dCTPを用いることが好ましい。1回のハイブリダイゼーションに必要なmRNA量は、液量や標識方法によって異なるが、数μg以下であることが好ましい。尚、DNAチップ上のDNA断片がオリゴDNAである場合には、試料核酸断片は低分子化しておくことが望ましい。原核生物の細胞では、mRNAの選択的な抽出が困難なため、全RNAを標識することが好ましい。試料核酸断片は、遺伝子の変異や多

型を調べる目的では、標識プライマーもしくは標識 dNTP を含む反応系で標的領域の PCR を行って得ることが好ましい。

【0033】ハイブリダイゼーションは、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注しておいた、標識した試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる水性液を、上記で作製したDNAチップ上に点着することによって実施することが好ましい。点着の量は、1乃至100nLの範囲にあることが好ましい。ハイブリダイゼーションは、室温乃至70℃の温度範囲で、そして6乃至20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の試料核酸断片を除去することが好ましい。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが特に好ましい。

【0034】DNAチップを用いるハイブリダイゼーションの特徴は、標識した試料核酸断片の使用量が非常に少ないことである。そのため、固相担体に固定するDNA断片の鎖長や標識した試料核酸断片の種類により、ハイブリダイゼーションの最適条件を設定する必要がある。遺伝子発現の解析には、低発現の遺伝子も十分に検出できるように、長時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。一塩基変異の検出には、短時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。また、互いに異なる蛍光物質によって標識した試料核酸断片を二種類用意し、これらを同時にハイブリダイゼーションに用いることにより、同一のDNAチップ上で発現量の比較や定量ができる特徴もある。

#### 【0035】

【実施例】【実施例1】DNA断片固定スライドの作成、およびDNA断片の固定量の測定本発明の固定方法を、DNA断片の反応経路によって表すこととし、その反応経路を図2に示す。図中、1は、スライドガラスを表す。

(1) カルボン酸基が導入されたスライド (C) の作成  
2重量%アミノプロピルエトキシシラン (信越化学工業 (株) 製) のエタノール溶液に、スライドガラス (25mm×75mm) を10分間浸した後取り出し、エタノールで洗浄後、110℃で10分間乾燥して、シラン化合物被覆スライド (A) を作成した。次いで、このシラン化合物被覆スライド (A) を、無水コハク酸 (2.5g) の1-メチル-2-ピロリドン (50mL) 溶液に1時間浸した後取り出し、アセトニトリルで洗浄し、1時間減圧下乾燥した。乾燥後の、末端にカルボン酸基が導入されたスライド (B) を、WSC (水溶性カルボジイミド) (955mg) およびN-ヒドロキシスクシンイミド (575mg) のアセトニトリル (50mL) 溶

液に2時間浸し、アセトニトリルで洗浄し、1時間減圧下に乾燥し、カルボン酸基が導入されたスライド (C) を得た。

#### (2) DNA断片の点着と蛍光強度の測定

3' 末端および5' 末端がそれぞれアミノ基、蛍光標識試薬 (FluoroLink Cy5-dCTP、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製) で修飾されたDNA断片 (3'-CTAGTCTGTGAAGTGTCTGATC-5') を0.1M炭酸緩衝液 (pH 9.3) に分散してなる水性液 ( $1 \times 10^{-6}$  M、1μL) を、上記 (1) で得たスライド (C) に点着した。直ちに、点着後のスライドを25℃、湿度90%にて1時間放置した後、このスライドを0.1重量% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) と2×SSC (2×SSC: SSCの原液を2倍に希釈した溶液、SSC: 標準食塩-クエン酸緩衝液) との混合溶液で2回、0.2×SSC水溶液で1回順次洗浄した。次いで、上記の洗浄後のスライドを0.1Mグリシン水溶液 (pH 10) 中に1時間30分浸漬した後、蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させ、DNA断片が固定されたスライド (D1) を得た。このスライド (D1) 表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、1680であった。本発明の固定化方法により、DNA断片が効率よくスライドガラスに固定されたことが分かる。

#### 【0036】【実施例2】試料DNA断片の検出

##### (1) DNAチップの作成

3' 末端が蛍光標識試薬で修飾されていないDNA断片を用いる以外は実施例1と同様にして、DNA断片が固定されたスライド (D2) を得た。

##### (2) 試料DNA断片の検出

5' 末端にCy5が結合した22merの試料オリゴヌクレオチド (GATCAGACACTTCACAGACTAG-5') をハイブリダイゼーション用溶液 (4×SSCおよび10重量%のSDSの混合溶液) (20μL) に分散させたものを、上記 (1) で得たスライド (D2) に点着し、表面を顕微鏡用カバーガラスで保護した後、モイスチャンバー内にて60℃で20時間インキュベートした。次いで、このものを0.1重量% SDSと2×SSCとの混合溶液、0.1重量% SDSと0.2×SSCとの混合溶液、および0.2×SSC水溶液で順次洗浄した後、600rpmで20秒間遠心し、室温で乾燥した。スライドガラス表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、632であった。本発明の固定化方法によって作成されたDNAチップを用いることによって、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する試料DNA断片を検出できることが分かる。

#### 【0037】

【発明の効果】本発明によって、固相担体表面にDNA断片を安定かつ迅速に固定することができる。特に、固

相担体表面にアミノ基をシランカップリング剤を用いて導入した場合には、アミノ基の固相担体表面への結合も、DNA断片の結合も共に共有結合であるため、強固にDNA断片を固定することができる。DNA断片の安定な固定は、遺伝子解析等に有効に利用することができる高い検出限界を有するDNAチップの作製に繋がるものである。その一つの例として、本発明によって作製されたDNAチップを用いて、試料核酸断片とのハイブリダイゼーションを行うことにより、DNAチップに固定

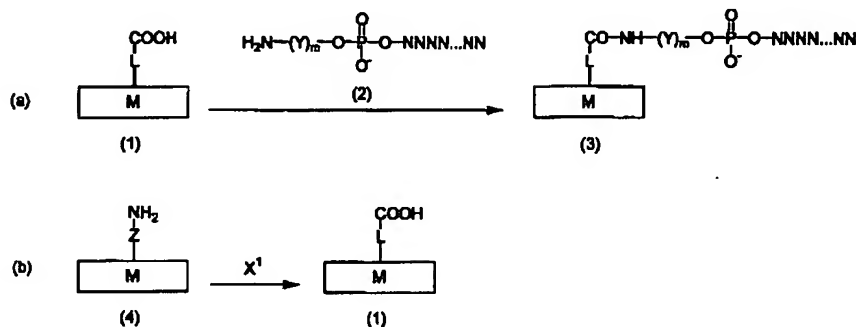
されているDNA断片に相補性を有する試料核酸断片を感度よく検出することができる。

【図面の簡単な説明】

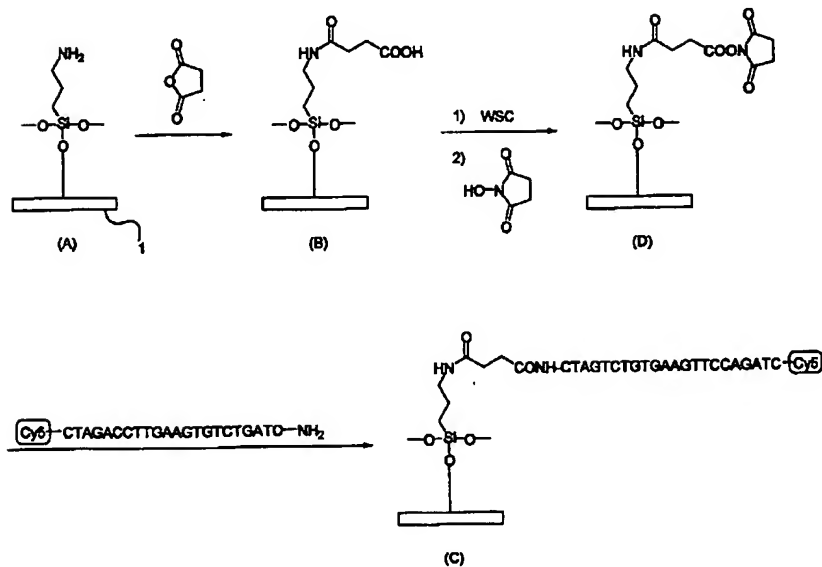
【図1】本発明の代表的な固定方法を示す模式図である。

【図2】本発明のDNA断片の固定方法（シランカップリング剤を用いる固相担体表面へのアミノ基の導入する工程を含む）を示す模式図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 瀬志本 修  
埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ  
イルム株式会社内

!(8) 001-108683 (P2001-183

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 HA12  
4B063 QA01 QA17 QA18 QQ42 QR32  
QR56 QR84 QS03 QS22 QS34  
QS36 QX02